大螟 HSC70 基因克隆及表达模式分析

孙 猛，陆明星，汤小天，杜予州*

（扬州大学园艺与植物保护学院，江苏扬州 225009）

摘要：【目的】近年来，大螟 *Sesamia inferens*（Walker）对水稻的为害逐渐加重并成为水稻的重要害虫之一。随着全球气候变暖，大螟的分布区域也在逐渐向北延伸。HSP70 家族作为分子伴侣参与生物生长发育并对外界刺激产生响应，对生物功能蛋白质的正确折叠及其转运有着重要意义。本研究旨在明确 HSP70 家族 HSC70 基因在大螟不同组织、不同发育阶段以及低温胁迫下的表达差异，初步探讨大螟对环境适应的分子机理。【方法】应用 RT-PCR 及 RACE 技术从大螟 5 龄幼虫中克隆得到 HSC70 基因；进行基因组验证，得到其基因组序列，分析内含子的位置及大小；应用实时定量 PCR 技术分析大螟 HSC70 基因的表达模式。【结果】大螟 HSC70 基因长 2 160 bp，命名为 *Sihsc*70（GenBank 登录号：KJ639908），开放阅读框长 1 962 bp，编码 653 个氨基酸，推测分子量为 71.6 kDa。其氨基酸序列中含有 3 个 HSP70 家族保守序列，在 C-末端存在细胞质定位信号，说明大螟 HSC70 是细胞质热激蛋白家族成员。大螟 HSC70 基因组序列长度为 3 522 bp（GenBank 登录号：KJ639909），含有 2 个内含子，长度分别为 685 bp（位于编码区上游）和 803 bp（位于编码区内）。在大螟 5 龄幼虫的不同组织中 *Sihsc*70 表达量差异不显著（$P>0.05$），其中在中肠、后肠和体壁中的表达量较高，在唾腺中的表达量最低；在大螟不同发育阶段中，*Sihsc*70 的表达量在雌成虫最低，较高的 3 个阶段依次为卵、2 龄幼虫和 5 龄幼虫，分别为雌成虫表达量的 6.33，3.21 和 1.86 倍；相对于对照组（27℃），低温胁迫对大螟 5 龄幼虫 HSC70 基因表达的影响差异不显著（$P>0.05$）。【结论】结果说明，大螟 HSC70 基因在不同发育阶段和幼虫不同组织中具有不同的表达水平，而低温胁迫不能诱导该基因大量表达。

关键词：大螟；HSC70；克隆；表达模式；荧光定量 PCR

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2014)07-0787-11

Molecular cloning and expression profiling of HSC70 gene in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae)

SUN Meng, LU Ming-Xing, TANG Xiao-Tian, DU Yu-Zhou* (School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: 【Aim】In recent years, the pink borer, *Sesamia inferens* (Walker) has become one of the major pests of rice with its damage increasing. With the global warming, it is further dispersing northward. Heat shock protein 70 (HSP70) family is of great significance for the correct fold and transmission of proteins in organisms. HSP70 participates in growth and development of organisms as chaperones, and causes responses to external stimuli. Our study aims to understand the expression differences of HSC70 gene from *S. inferens* in different tissues, in different developmental stages and under low-temperature stress, and to explore the molecular mechanisms of environmental adaptability of *S. inferens*. 【Methods】RT-PCR and RACE were used to clone the full-length cDNA of HSC70 gene from the 5th instar larvae of S. *inferens*. The genomic sequence was demonstrated by genomic validation and intron was analyzed by sequence analysis of cDNA. The expression patterns of HSC70 gene were investigated by real-time quantitative PCR. 【Results】The complete cDNA sequence was obtained and named as *Sihsc*70 (GenBank accession no.: KJ639908), which is 2 160 bp in length, containing an opening reading frame (ORF) of 1 962 bp and encoding 653 amino acid residues with the predicted molecular weight of 71.6 kDa. Three conserved sequences of HSP70 family exist in its amino acid sequence. The cytoplasmic localization signal in C-terminus indicated that *S. inferens* HSC70 is a cytoplasmic heat shock protein. Analysis of genomic DNA sequence (GenBank accession no.:

基金项目：国家重点基础研究发展计划（"973"计划）项目（2012CB114100）；国家自然科学基金项目（31371937）

作者简介：孙猛，男，1984 年生，山东枣庄人，博士研究生，研究方向为昆虫分子生态，E-mail：sunmeng8888@aliyun.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期 Received：2014-04-18；接受日期 Accepted：2014-05-27

KJ639909) demonstrated that HSC70 gene contains 2 introns. The 1st intron, 685 bp in length, is located upstream of the coding region. The 2nd intron, 803 bp in length, is located in the coding region. The expression levels of *Sihsc*70 were not significantly different among different tissues of the 5th instar larva ($P > 0.05$), with the higher expression levels in midgut, hindgut and epidermis, and the lowest in salivary glands. *Sihsc*70 had the lowest expression level in female adults, and higher expression levels in eggs, 2nd and 5th instar larvae, which were 6.33-, 3.21- and 1.86-fold as high as that in female adults, respectively. Compared with the control group (27℃), low-temperature stress had no significant effect on the expression of *Sihsc*70 in the 5th instar larvae ($P > 0.05$).【Conclusion】The results suggest that *Sihsc*70 has different expression levels in different developmental stages and different larval tissues, and low-temperature stress would not induce high expression of this gene.

Key words: *Sesamia inferens*; HSC70; cloning; expression pattern; real-time quantitative PCR

热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类广泛存在于各种生物中可以被多种外界胁迫因子(如高温、低温、干燥、杀虫剂、重金属、饥饿和缺氧等)诱导表达的特殊蛋白质,也被称为应激蛋白(stress proteins)(Lindquist, 1986; Nover and Scharf, 1997; Feder and Hofmann, 1999; Kregel, 2002)。热激蛋白常作为分子伴侣防止蛋白质前体积累,协助蛋白质跨膜运输,维持蛋白质的正常折叠状态,促进错误折叠的蛋白质降解,在蛋白质从头折叠及外界胁迫下稳定多肽链并防止蛋白质失活(Parsell and Lindquist, 1993; Hartl and Hayar-Hartl, 2002)。按照分子量可以将热激蛋白主要分为5大类:HSP110(100 ~ 104 kDa), HSP90(82 ~ 90 kDa), HSP70(68 ~ 75 kDa), HSP60(58 ~ 65 kDa)和sHSPs(15 ~ 40 kDa)(Denlinger *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007)。HSP70家族高度保守,是迄今研究最为深入的热激蛋白家族。根据其表达模式可以分为3类:第一类是组成型(solely constitutive,以HSC70表示),在所有细胞内均能表达,不能被外界胁迫刺激大量诱导表达;第二类为诱导型(solely inducible),在正常细胞中少量表达,能够被胁迫刺激大量诱导表达;第三类为兼有组成型和诱导型特征的中间型(constitutive and inducible),既在细胞中普遍表达,也可被胁迫刺激显著诱导表达(Callahan *et al.*, 2002; Boutet *et al.*, 2003; Ravaux *et al.*, 2007; Sørensen, 2010)。上述3类HSP70在结构上具有相似的特点,都含有1个约44 kDa的N-端保守ATP结合结构域、1个约18 kDa的多肽结合结构域和1个10 kDa的C-端不保守区域(Gkouvitsas *et al.*, 2009; Zhang and Denlinger, 2010)。

大螟 *Sesamia inferens* (Walker),又名稻蛀茎夜蛾、紫螟,隶属于鳞翅目(Lepidoptera),夜蛾科(Noctuidae),蛀茎夜蛾属 *Sesamia*。大螟广泛分布于东南亚产稻国家(菲律宾、越南、老挝、柬埔寨等)及南太平洋岛屿(巴布亚新几内亚等),在朝鲜、日本、印度等国家也有报道(Azuma, 1977; Mia and Iwahashi, 1999)。过去的研究认为,大螟在我国的分布北限大致在34°N的陕西周至、河南信阳、安徽合肥和江苏淮阴一线(章士美,1965;顾海南,1985)。随着全球气候变暖,大螟的分布北限也在逐渐向北扩展,已经在分布北限以北的稻区中发现大螟危害(杜予州等,未发表资料)。大螟原为一种水稻上的常发次要害虫,然而在近几十年,江苏等省相继报道大螟种群数量迅速回升,对水稻为害逐渐加重并上升为主要害虫之一(陈复斌和刘福海,2001;李洪山等,2002;徐修龙等,2009;徐丽娜等,2011;吉海龙等,2012;樊道怀等,2014)。为此,我们对大螟HSC70基因进行克隆,分析其基因组及蛋白质特征以及在不同组织、发育阶段和低温胁迫下表达差异,以探讨大螟对环境适应的分子机理,为做好该虫的综合治理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试虫源采自江苏省扬州市郊区稻田(32°39′N,119°42′E)。参照韩超等(2012)饲养方法,在实验室条件下(温度27 ±1℃,相对湿度70%,光周期16L:8D)连续饲养大螟达3代以上作供试虫源。

1.2 总RNA提取

取实验室饲养3代以上的5龄大螟幼虫,参照SV Total RNA分离纯化试剂盒(Promega)说明书步骤提取大螟总RNA。使用1%琼脂糖凝胶电泳(DYY-4C电泳仪)和微量分光光度计(Eppendorf BioPhotometer Plus)检测RNA的完整度、纯度与浓度。将合格的总RNA样品于 -80℃超低温冰箱

(Thermo Fisher)内保存备用。

1.3　HSC70 基因中间片段的克隆

将无核酸酶的离心管置于冰上，依次加入：2 μL 模板 RNA，1 μL 引物 oligo (dT)$_{18}$，加 DEPC 水至 15 μL，然后在上述离心管中依次加入：5 μL M-MLV 5×Buffer，1.25 μL dNTPs Mixture(各 10 mmol/L)，1 μL M-MLV Reverse Transcriptase 和 2.75 μL RNase-free ddH_2O。将混合物短暂离心，置于 42℃温育 60 min，然后 70℃下加热 5 min，反应产物立即置于 -20℃冻存备用。

在灭菌 PCR 管中依次加入：2.5 μL 10×Taq Buffer、2 μL dNTPs、1 μL cDNA 模板、上下游引物各 1 μL(表 1)、0.25 μL Taq 酶(TaKaRa)。加 ddH_2O 至 25 μL，在 PCR 仪(S-100，Bio-Rad)上采用降落 PCR 扩增中间片段，程序如下：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，60℃ 30 s，-1℃/循环，72℃延伸 1 min 共 9 个循环；然后 94℃变性 30 s，50℃ 30 s，70℃延伸 1 min，共 25 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存。取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，观察有无目的条带。

表 1　研究中使用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequences	产物长度(bp) Amplicon size	退火温度(℃) T_m	用途 Purpose
hsc70DP-F	TACTTCAAYGACTCWCAG	257	56	中间片段扩增 Intermediate fragment amplification
hsc70DP-R	TCRAAGTCCTCDCCKCCSA			
hsc70RACE-5′	CACATCAAAGGTTCCGCCGCCGA	727	65.5	5′RACE
hsc70RACE-3′	GGTGACACACATTTGGGAGGAGAGG	1 385	65.3	3′RACE
hsc70cDNA-F	CTTTGCCGAGTTACTCTACGA	2 043	56	cDNA 全长验证 Verification of full-length cDNA
hsc70cDNA-R	CTGTATAATCTGTTGGAATGTTT			
hsc70DNA1-F	CTTTGCCGAGTTACTCTACGA	947	55	基因组验证 Verification of genome
hsc70DNA1-R	TTGTGTTGTTGGGGTTCA			
hsc70DNA2-F	TGAACCCCAACAACACAA	920	53	
hsc70DNA2-R	TGCCACCATCACTGACAA			
hsc70DNA3-F	GGTTGTCAGTGATGGTGG	1 693	55	
hsc70DNA3-R	CTGTTGGAATGTTTAGTCG			
hsc70qRT-F	GCGATGAACCCCAACAACA	107	58.2	qRT-PCR 检测目的基因 Target gene detection with qRT-PCR
hsc70qRT-R	ACAACCTCGAAAGGCCAGTG			
18SqRT-F	CAACACGGGAAATCTCACCA	115	55.6	qRT-PCR 检测内参基因 Reference gene detection with qRT-PCR
18SqRT-R	GACAAATCGCTCCACCAACTAA			
ef1qRT-F	GTCGCTTTCGTACCCATTTCT	86	56.6	
ef1qRT-R	ACAGTCCATCCCTTGAACCAG			
gapdhqRT-F	GGTCATCTCCAACGCTTCCT	166	56.6	
gapdhqRT-R	ACGTCCATCACGCCACAAT			
rps13qRT-F	TGGTAAGGGTATCTCCCAATCA	75	60.1	
rps13qRT-R	TCGTCAGCAGTCAGTTTCAGC			
rps20qRT-F	CTCATCAATGGAGCCAAGAAAC	162	60.1	
rps20qRT-R	GTGCAGGTCAATGACACGCT			
tubqRT-F	TTGCTACAGAACCCTCAAAGTGC	159	59.2	
tubqRT-R	AGACGTGGGAACGGAACCAT			

检测到目的条带后，将剩余产物全部进行琼脂糖凝胶电泳，参照 Axyprep DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen)说明书步骤回收 PCR 产物。将目的片段进行载体连接，方法参照 pGEM-T Easy Vector 试剂盒(Promega)说明书。将连接产物进一步进行 DH5α 感受态细胞转化。菌液 PCR 初步验证后，送菌液至上海英骏生物技术有限公司测序，每个测序送 3 个以上克隆。

1.4　HSC70 基因 5′和 3′末端片段克隆

参照 SMARTer^{TM} RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech)说明书合成 5′和 3′cDNA 第一条链，cDNA 产物保存于 -20℃待用。根据已得到的中间片段序列，分别设计 5′引物和 3′引物(表 1)。5′和 3′片段扩增体系为：0.5 μL TaKaRa La Taq(5 U/μL)，5 μL 10×La PCR Buffer II(Mg^{2+} free)，5 μL $MgCl_2$(25 mmol/L)，8 μL dNTPs Mixture(各 2.5

mmol/L),2 μL 5′或 3′cDNA 模板,2 μL 引物 5′或 3′引物(10 mmol/L),5 μL UPM(10 ×),22.5 μL RNase-free ddH$_2$O。PCR 程序为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 2 min,35 个循环;然后 72℃延伸 10 min 后 4℃保存。PCR 产物的检测、回收、连接、转化、测序均与中间片段扩增方法一致。

1.5 HSC70 基因序列拼接与分析

测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)予以确认后用 DNAMAN 拼接得到基因全长,利用 ORF Finder(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)查找基因完整的开放阅读框(opening reading frame, ORF)。然后在 ORF 两侧设计引物进行基因全长验证以确认其准确性(表 1)。使用 SWISS 生物信息学研究所 ExPASy 分子生物学序列分析工具包括翻译、评估 pI/MW 和 Blast 分析推导氨基酸序列(Gasteiger *et al*., 2003)。使用 MEGA6.06 软件采用邻接法、最小进化法、最大似然法和最大简约法构建大螟系统进化树。

1.6 HSC70 蛋白质结构分析

使用 Phyre2(http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html)以与大螟热激蛋白 70 最相似的蛋白质模型为模板,预测大螟热激蛋白 70 结构模型(Kelley and Sternberg, 2009)。使用 Chimera 软件调整三维结构和原子排列(Pettersen *et al*., 2004)。

1.7 HSC70 基因组验证

选取 5 龄大螟幼虫,参照 AxyPrep 基因组 DNA 小量试剂盒(Axygen)说明书步骤提取大螟基因组 DNA。基因组 DNA 样品置于 -20℃冰箱中保存备用。根据已获得的大螟热激蛋白基因全长 cDNA 序列,设计 3 对引物,分 3 段扩增基因组序列,跨越开放阅读框(表 1)。PCR 产物的检测、回收、连接、转化、测序均与中间片段扩增方法一致。测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索予以确认后用 DNAMAN 拼接得到基因组序列全长。与 cDNA 序列全长进行比对,分析内含子分布情况。

1.8 荧光定量 PCR 检测

选取 10 头室内饲养的大螟 5 龄幼虫,剪破幼虫腹足,轻压虫体,收集血淋巴于同一无菌离心管中,用液氮迅速冷冻后放入 -80℃保存备用。将提取完血淋巴的大螟幼虫固定在蜡盘上,置于解剖镜下解剖分离头部、体壁、脂肪体、前肠、中肠、后肠、马氏管和唾腺,用 PBS 缓冲液冲洗后,相同组织收集在同一无菌离心管中,用液氮迅速冷冻后放入 -80℃保存备用,每种组织(共 9 种)重复至少 3 次。

选取处于不同发育阶段的大螟:卵,2 ~ 3 块卵块(约 50 粒卵);1 龄幼虫,2 ~ 3 块卵块所孵出 1 龄幼虫(约 50 头);2 龄幼虫,10 头;3 龄幼虫,5 头;4 龄幼虫,3 头;5、6 龄幼虫、蛹(雌与雄)和成虫(雌与雄):各 1 头。用液氮迅速冷冻后放入 -80℃保存备用。每种虫态(共 11 种)重复至少 3 次。

分别选取室内饲养的大螟 5 龄幼虫在低温恒温槽(HTD0506)中 -8, -6, -4, -2, 0 和 27℃(对照)处理 2 h,27 ± 1℃恢复 2 h 后观察存活率。每种处理选取至少 3 头存活幼虫,用液氮迅速冷冻后放入 -80℃保存备用。

各样品总 RNA 提取方法同 1.2 节。参照 PrimeScript RT Reagent Kit Perfect Real Time 试剂盒(Bio-Rad)说明书步骤合成 cDNA 第一条链。将无核酸酶的离心管置于冰上,依次加入:4 μL 5 × iScript Reaction Mix, 1 μL iScript Reverse Transcriptase, 0.5 μg RNA 模板,加 nuclease-free ddH$_2$O 至 20 μL。将混合物短暂离心后置于 PCR 仪上进行后续反应,PCR 程序为:25℃ 5 min;42℃ 30 min;85℃ 5 min,产物置于 4℃保存备用。

根据大螟 HSC70 基因全长设计用于荧光实时定量 PCR 的引物 hsc70qRT-F 和 hsc70qRT-R,根据前期已获得的内参基因部分序列设计相应引物(表 1)。不同组织内参基因组合:核糖体蛋白 S13 基因(*rps*13)、核糖体蛋白 S20 基因(*rps*20)、延伸因子 1 基因(*ef*1)和微管蛋白基因(*tub*);不同发育阶段内参基因组合:18S 核糖体 RNA(18S rRNA)、*ef*1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*gapdh*)和 *tub*;低温处理内参基因组合:18S rRNA, *rps*20, *tub* 和 *ef*1。以上内参基因方案已经过筛选验证(另文发表)。

运用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 real-time PCR 分析。使用 CF96X PCR 仪(Bio-Rad)进行 PCR 反应,体系如下:iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix(2 ×)10 μL,上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μL(表 1),cDNA 模板(10 倍稀释)2 μL,灭菌 ddH$_2$O 6 μL。荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s, T_m(表 1)30 s,40 个循环,反应结束后读取 Ct 值。作 *hsc*70 和各内参基因的熔解曲线及标准曲线。然后使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行相对表达量分析。

1.9 数据统计与分析

使用 PASW Statistics 18.0 软件的 Tukey 氏多重比较检验进行大螟 HSC70 基因表达差异分析。

2　结果与分析

2.1　大螟 HSC70 基因序列分析

以大螟 cDNA 为模板，用中间片段引物进行 PCR 扩增得到 257 bp 的特异性条带，经回收、克隆、测序。将测序结果进行 Blast 比对发现与西非蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides*（Lefebvre）的 HSC70 基因（*hsc*70）序列对应片段相似度达到 98%，表明该片段为大螟 HSC70 基因（*hsc*70）中间片断。进一步使用 RACE 技术扩增得到大螟 *hsc*70 的 5′端序列（727 bp）和 3′端序列（1 385 bp）。利用 DNAMAN 拼接这 3 个片段可得到 2 160 bp 的大螟 *hsc*70 全长，cDNA 序列全长验证表明所获得的 *hsc*70 序列正确可靠，故命名为 *Sihsc*70（GenBank 登录号：KJ639908）。同时将大螟 *hsc*70 与西非蛀茎夜蛾的 *hsc*70 比对，发现二者之间核苷酸序列一致性高达 97%。

ORF Finder 分析显示，*Sihsc*70 包含 103 bp 的 5′非编码区（5′untranslated region，5′UTR）、1 962 bp 的 ORF 和 95 bp 的 3′非编码区（3′untranslated region，3′UTR），3′UTR 末端具有典型的 ploy A 结构。*Sihsc*70 共编码 653 个氨基酸，预测蛋白质分子量为 71.6 kDa，预测等电点为 5.32。具有 3 个 HSP70 家族签名序列：IDLGTTYS（第 10 – 17 位 aa）、IFDLGGGTFDVSIL（第 198 – 211 位 aa）和 IVLVGGSTRIPKVQK（第 335（349 位 aa）。在第 132 – 139 位 aa 处有 1 个 ATP-GTP 结合位点（AEAYLGKT），在第 300 – 306 位 aa 处有 1 个非细胞器保守位点（RARFEEL），在第 251 – 256 和 262 – 266 位 aa 处有 2 个核定位信号（KK 和 RRLRT）；C – 末端（第 650 – 653 位 aa）有 1 个保守的细胞质定位信号（EEVD），说明大螟 HSC70 是细胞质热激蛋白家族成员（图 1）（Gupta and Golding, 1993）。


```
1     ACATGGGGATTTTTTTCGTGAACAGACGCCGTCAATCGCGCACCTTTGCCGAGTTACTCTACGAGTTAAGTCAACGACTGAGATAGTTAT
91    AGAAAATCAAAAAATGGCAGCAAAAGCACCCGCTGTAGGTATTGACTTGGGTACCACTTACTCGTGCGTGGGAGTTTTCCAGCATGGTAA
1                    M  A  A  K  A  P  A  V  G  I  D  L  G  T  T  Y  S  C  V  G  V  F  Q  H  G  K
181   GGTGGAGATCATCGCAAATGACCAGGGCAACAGGACCACGCCCTCATATGTAGCGTTCACCGACACCGAGCGTCTCATCGGAGATGCCGC
27     V  E  I  I  A  N  D  Q  G  N  R  T  T  P  S  Y  V  A  F  T  D  T  E  R  L  I  G  D  A  A
271   CAAGAACCAGGTGGCGATGAACCCCAACAACACAATTTTCGATGCCAAACGTCTCATCGGACGCAAATTCGAAGATGCTACTGTACAAGC
57     K  N  Q  V  A  M  N  P  N  N  T  I  F  D  A  K  R  L  I  G  R  K  F  E  D  A  T  V  Q  A
361   TGACATGAAGCACTGGCCTTTCGAGGTTGTCAGTGATGGTGGCAAGCCAAAGATCAAGGTTGCATACAAGGGTGAAGATAAAACCTTCTT
87     D  M  K  H  W  P  F  E  V  V  S  D  G  G  K  P  K  I  K  V  A  Y  K  G  E  D  K  T  F  F
451   CCCTGAGGAAGTTAGCTCAATGGTGCTCACAAAAATGAAGGAAACAGCCGAGGCATACCTTGGCAAAACGGTGCAGAATGCAGTAATTAC
117    P  E  E  V  S  S  M  V  L  T  K  M  K  E  T  A  E  A  Y  L  G  K  T  V  Q  N  A  V  I  T
541   GGTTCCAGCGTACTTCAATGACTCACAGAGACAAGCCACAAAAGATGCGGGTACCATCTCCGGTTTGAATGTTCTCCGTATTATCAATGA
147    V  P  A  Y  F  N  D  S  Q  R  Q  A  T  K  D  A  G  T  I  S  G  L  N  V  L  R  I  I  N  E
631   ACCAACTGCTGCTGCGATTGCATACGGCCTTGACAAGAAGGGTAGTGGAGAACGAAATGTACTGATTTTCGATCTCGGCGGCGGAACCTT
177    P  T  A  A  A  I  A  Y  G  L  D  K  K  G  S  G  E  R  N  V  L  I  F  D  L  G  G  G  T  F
721   TGATGTGTCCATCCTGACCATCGAGGATGGTATCTTCGAAGTAAAGTCCACCGCTGGTGACACACATTTGGGAGGAGAGGACTTCGACAA
207    D  V  S  I  L  T  I  E  D  G  I  F  E  V  K  S  T  A  G  D  T  H  L  G  G  E  D  F  D  N
811   CCGCATGGTCAACCACTTTGTGCAGGAGTTCAAGAGGAAATACAAAAAGGACCTTGCCACCAACAAGAGGGCCCTTAGGCGATTGCGCAC
237    R  M  V  N  H  F  V  Q  E  F  K  R  K  Y  K  K  D  L  A  T  N  K  R  A  L  R  R  L  R  T
901   CGCTTGTGAAAGGGCGAAGAGAACTCTCTCCTCGTCCACACAGGCTAGCATTGAAATCGACTCTCTGTTTGAGGGTATTGACTTCTACAC
267    A  C  E  R  A  K  R  T  L  S  S  S  T  Q  A  S  I  E  I  D  S  L  F  E  G  I  D  F  Y  T
991   ATCCATTACCAGGGCACGATTCGAGGAACTGAATGCKGATCTGTTCAGATCTACCATGGAGCCTGTGGAGAAGTCCCTCCGTGATGCAAA
297    S  I  T  R  A  R  F  E  E  L  N  A  D  L  F  R  S  T  M  E  P  V  E  K  S  L  R  D  A  K
1081  GATGGACAAGTCTCAAATCCACGATATCGTACTTGTAGGTGGTTCTACTCGTATTCCCAAAGTGCAGAAGCTCCTTCAAGACTTCTTTAA
327    M  D  K  S  Q  I  H  D  I  V  L  V  G  G  S  T  R  I  P  K  V  Q  K  L  L  Q  D  F  F  N
1171  TGGCAAGGAGCTTAACAAATCCATCAACCCCGACGAGGCCGTAGCTTACGGTGCTGCCGTCCAGGCCGCCATCTTGCACGGTGACAAGTC
357    G  K  E  L  N  K  S  I  N  P  D  E  A  V  A  Y  G  A  A  V  Q  A  A  I  L  H  G  D  K  S
1261  TGAGGAGGTACAGGATCTGCTGCTTCTCGACGTGACTCCGCTGTCGCTCGGTATCGAAACGGCCGGTGGTGTCATGACCACCCTCATCAA
377    E  E  V  Q  D  L  L  L  L  D  V  T  P  L  S  L  G  I  E  T  A  G  G  V  M  T  T  L  I  K
1351  ACGCAACACCACTATTCCCACCAAGCAGACCCAGACCTTTACCACCTACTCTGACAACCAGCCTGGAGTACTCATTCAGGTCTTCGAGGG
407    R  N  T  T  I  P  T  K  Q  T  Q  T  F  T  T  Y  S  D  N  Q  P  G  V  L  I  Q  V  F  E  G
1441  CGAGCGCGCCATGACCAAGGATAACAATTTGCTCGGAAAGTTTGAGCTGACCGGCATTCCTCCCGCGCCGCGTGGCGTACCTCAAATCGA
437    E  R  A  M  T  K  D  N  N  L  L  G  K  F  E  L  T  G  I  P  P  A  P  R  G  V  P  Q  I  E
1531  AGTCACCTTCGACATCGACGCTAACGGCATTCTTAACGTGTCTGCCGTCGAGAAATCGACTAACAAGGAGAACAAGATTACCATTACCAA
467    V  T  F  D  I  D  A  N  G  I  L  N  V  S  A  V  E  K  S  T  N  K  E  N  K  I  T  I  T  N
1621  CGACAAAGGCCGTCTTTCAAAGGAAGAGATTGAGCGCATGGTCAATGAGGCCGAGAAATACAGGACTGAGGATGAGAAGCAGAAGGAGAC
497    D  K  G  R  L  S  K  E  E  I  E  R  M  V  N  E  A  E  K  Y  R  T  E  D  E  K  Q  K  E  T
1711  CATCCAGGCTAAGAATGCTCTGGAATCTTACTGCTTCAATATGAAGTCCACAATGGAGGATGAGAAGCTCAAGGACAAAATCTCWGACTC
527    I  Q  A  K  N  A  L  E  S  Y  C  F  N  M  K  S  T  M  E  D  E  K  L  K  D  K  I  S  D  S
1801  TGACAAACAGACTATCTTGGACAAGTGCAACGACACCATCAAATGGCTGGACTCCAATCAGCTGGCTGATAAGGAAGAATATGAGCACAA
557    D  K  Q  T  I  L  D  K  C  N  D  T  I  K  W  L  D  S  N  Q  L  A  D  K  E  E  Y  E  H  K
1891  GCAGAAGGAGCTGGAAGGCATTTGCAACCCTATTATCACAAAGATGTACCAGGGAGCAGGTGGTATGCCCGGCGGTATGCCCGGTGGTAT
587    Q  K  E  L  E  G  I  C  N  P  I  I  T  K  M  Y  Q  G  A  G  G  M  P  G  G  M  P  G  G  M
1981  GCCCGGCTTCCCTGGAGCCGCTCCCGGCGCTGGAGGTGCTGCCCCCGGTGGCGGTGCCGGCCCTACCATCGAAGAGGTCGACTAAACATT
661    P  G  F  P  G  A  A  P  G  A  G  G  A  A  P  G  G  G  A  G  P  T  I  E  E  V  D  *
2071  CCAACAGATTATACAGCAAGCTTTTACTGATATTGCAGTATTCAACTACAGTACAGTGTCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 1　大螟 HSC70 基因 cDNA 序列及其编码氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of HSC70 gene from *Sesamia inferens*

黄色表示 3 个 *hsp*70 家族签名序列，蓝色表示 1 个 ATP-GTP 结合位点，紫色表示 1 个非细胞器保守位点，绿色表示 2 个核定位信号，红色表示细胞质定位信号。Three signature sequences of *hsp*70 family are shaded in yellow, a putative ATP-GTP binding site are in blue, an organelles conservative site is in purple, two nuclear localization signals are in green, and the cytoplasmic HSC70 carboxyl terminal region is in red.

2.2　大螟 HSC70 结构预测

使用 Phyre2 软件(http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html)，以酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen) HSP70(PDB ID: c3d2fC)(Polier *et al.*, 2008)为模板预测出 *Si*HSC70 结构模型。通过序列搜索,可以在预测结构中找到 3 个 HSP70 家族签名序列、1 个 ATP-GDP 结合位点、1 个非细胞器保守位点和 2 个核定位信号(图 2)。

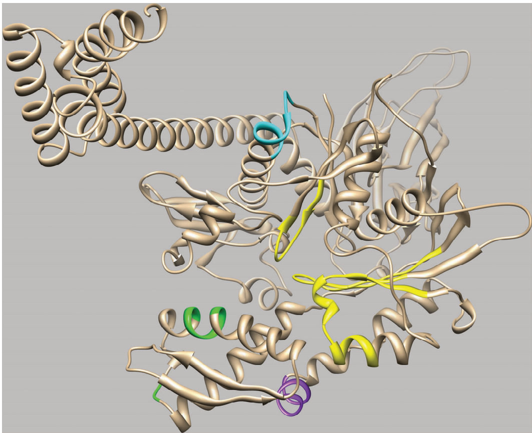


图 2　大螟 HSC70 结构预测图

Fig. 2　The structural prediction of HSC70 from *Sesamia inferens*

图中黄色表示 3 个 HSP70 家族签名序列,蓝色表示 1 个 ATP-GDP 结合位点,紫色表示 1 个非细胞器保守位点,绿色表示 2 个核定位信号。Three signature sequences of HSP70 family are indicated in yellow, a putative ATP-GTP binding site is in blue, an organelles conservative site is in purple, and two nuclear localization signals are in green.

2.3　大螟 HSC70 基因组序列分析

通过实验获得 *Sihsc*70 的基因组序列,长度为 3 522 bp(GenBank 登录号:KJ639909)。对比 cDNA 序列发现 *Sihsc*70 含有 2 个内含子,长度分别为 685 bp 和 803 bp。前者位于第 61 – 745 bp(基因组序列),编码区上游,紧挨着编码区;后者位于第 954 – 1 756 bp(基因组序列),编码区内,将编码区分割成 208 bp 和 1 754 bp 的前后 2 个片段。比较鳞翅目另外 2 个种 *hsc*70 基因组序列表明,*Sihsc*70 的内含子数量、插入位置和长度有所不同(图 3)。尽管大螟和八字地老虎 *Xestia c-nigrum* 都含有 1 个编码区外的内含子,但不同于大螟的是,八字地老虎的编码区外内含子长度(561 bp)略短于大螟,且与编码区之间也存在 6 bp 的间隔,而 *Sihsc*70 无间隔。3 种昆虫的 HSC70 基因的编码区内都存在内含子,但八字地老虎和粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 分别有 7 个和 2 个编码区内内含子,均多于大螟(1 个),且其位置不保守,长度也短于大螟。

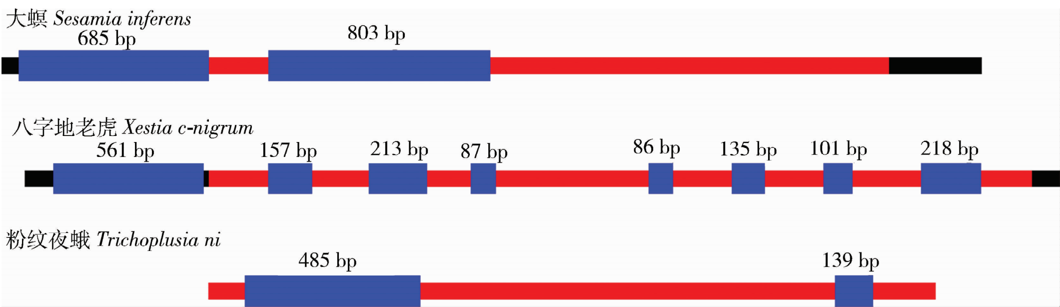


图 3　3 种鳞翅目昆虫 HSC70 基因基因组 DNA 结构图

Fig. 3　Structural analysis of the genomic sequence of HSC70 genes from three lepidopteran species

黑色为非编码区;蓝色为内含子,上方数据为该内含子长度;红色为编码区。Untranslated regions are in black; introns are in blue, and the numerals above indicate the length of regions; and the coding regions are in red.

2.4　大螟 HSC70 系统发育分析

利用 MEGA6.06 软件基于邻接法、最小进化法、最大简约法和最大似然法将鳞翅目昆虫 19 种 HSC70(包括 16 种细胞质 HSC70 和 3 种内质网 HSC70)以及黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的细胞质 HSC70 与大螟 HSC70 进行系统进化分析。发现 4 种建树方法得到进化关系一致,因此在本研究中只显示了最大似然法所得结果(图 4)。由图 4 可见,细胞质 HSC70 与内质网 HSC70 明显分为两支,而鳞翅目昆虫的细胞质 HSC70 全部聚在一支。大螟与其他夜蛾科昆虫聚为一支。由此可以看出,我们实验获得的 *Sihsc*70 序列是正确可靠的。

2.5　*Sihsc*70 的表达差异分析

经 qRT-PCR 分析,目的基因及各内参基因的熔解曲线均为单峰,扩增产物单一,扩增效率在 93.5% ~107.3% 之间,标准曲线的 R^2 值也均大于 0.950。达到进行实时定量研究的基本要求(Huggett *et al.*, 2005)。

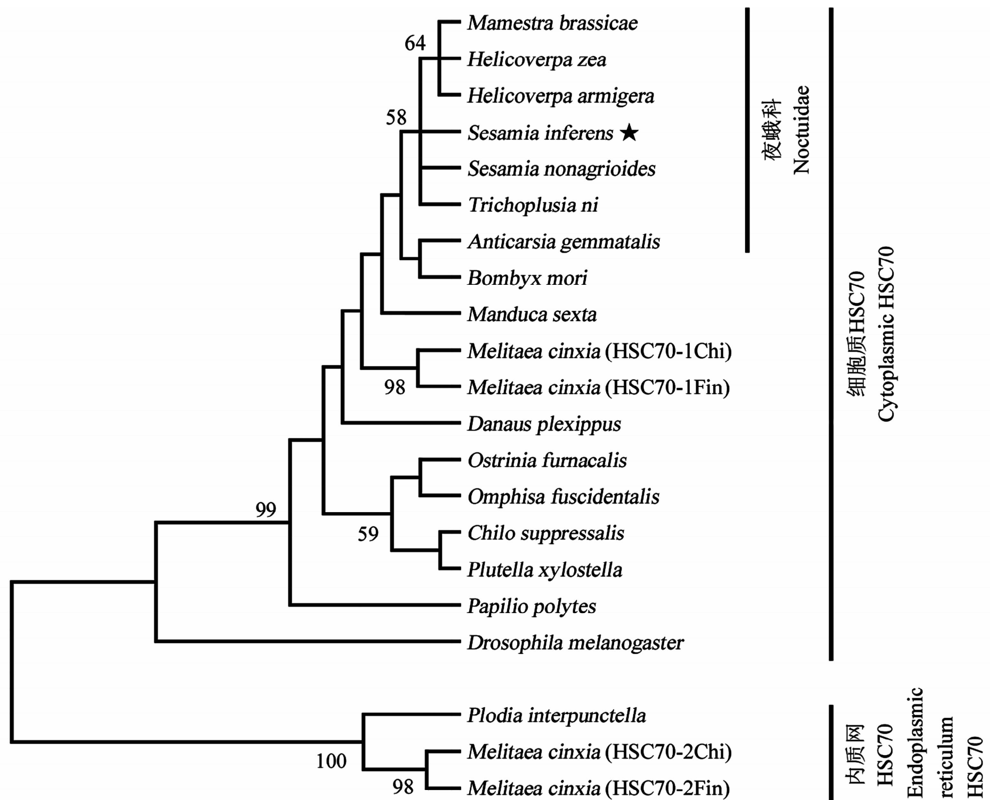


图 4　大螟 HSC70 与其他昆虫 HSC70 的系统发育树(最大似然法)

Fig. 4　Phylogenetic tree of SiHSC70 and other insect species based on maximum likelihood method

HSC70 序列来源及 GenBank 登录号 Origin of HSC70 proteins and their GenBank accession numbers: *Mamestra brassicae*: 甘蓝夜蛾, Q0KKB3; *Helicoverpa zea*:美洲棉铃虫, C8CCR4;*Helicoverpa armigera*: 棉铃虫, 19671576; *Sesamia inferens*: 大螟, KJ639908; *Sesamia nonagrioides*, 西非蛀茎夜蛾, Q4ZJ79; *Trichoplusia ni*: 粉纹夜蛾, Q94805;*Anticarsia gemmatalis*: 黎豆夜蛾, E3VS41; *Bombyx mori*; 家蚕, Q8N0P2; *Manduca sexta*: 烟草天蛾, Q9U639; *Melitaea cinxia* HSC70-1Chi: 庆网蛱蝶, 526299343; *Danaus plexippus*: 黑脉金斑蝶, G6DDQ9; *Omphisa fuscidentalis*: 竹蠹螟, 145693223; *M. cinxia*: HSC70-1Fin; 庆网蛱蝶, 526299329; *Ostrinia furnacalis*: 亚洲玉米螟, E5LEV4; *Chilo suppressalis*: 二化螟, Q3V6C5; *Plutella xylostella*: 小菜蛾, Q2WG65; *Papilio polytes*: 玉带凤蝶, I4DQY2; *Drosophila melanogaster*: 黑腹果蝇, 24663988; *Plodia interpunctella*: 印度谷螟, 124013458; *M. cinxia* HSC70-2Chi: 庆网蛱蝶, 526299417; *Melitaea cinxia* HSC70-2Fin: 庆网蛱蝶, 526299400。HSC70 amino acids were from the following species with their accession numbers: *Mamestra brassicae* (Q0KKB3), *Helicoverpa zea* (C8CCR4), *Helicoverpa armigera* (219671576), *Sesamia inferens* (KJ639908), *Sesamia nonagrioides* HSC70 (Q4ZJ79), *Trichoplusia ni* (Q94805), *Anticarsia gemmatalis* (E3VS41), *Bombyx mori* (Q8N0P2), *Manduca sexta* (Q9U639), *Melitaea cinxia* HSC70-1Chi (526299343), *Danaus plexippus* (G6DDQ9), *Omphisa fuscidentalis* (145693223), *M. cinxia* HSC70-1Fin (526299329), *Ostrinia furnacalis* (E5LEV4), *Chilo suppressalis* (Q3V6C5), *Plutella xylostella* (Q2WG65), *Papilio polytes* (I4DQY2), *Drosophila melanogaster* (24663988), *Plodia interpunctella* (124013458), *M. cinxia* HSC70-2Chi (526299417), and *M.* HSC70-2Fin (526299400). 各分支上的数字为自引导值(1 000 次重复,仅显示 >50 的值)。Numbers on the branches are the bootstrap values obtained from 1 000 replicates (only bootstrap values >50 are shown).

2.5.1　在 5 龄幼虫不同组织中的表达差异分析:结果表明,*Sihsc*70 在大螟 5 龄幼虫的不同组织中均有表达。其中在唾腺中的表达量最低;在中肠中的表达量最高,达到唾腺的 4.48 倍;其次是在体壁和后肠,表达量分别达到唾腺中的 3.50 和 3.33 倍;头部、前肠、血淋巴、脂肪体和马氏管中的 *Sihsc*70 表达量分别为唾腺的 1.84, 2.14, 2.65, 2.51 和 2.50 倍(图5: A)。但方差分析结果表明,*Sihsc*70 在各组织中的表达差异不显著($F_{8,18}=0.941$, $P=0.508$)。

2.5.2　不同发育阶段中的表达差异分析:*Sihsc*70 在大螟各个发育阶段中均有表达;其中在雌成虫体内表达量最低,在卵中的表达量最高,显著高于其他发育阶段($F_{10,21}=17.411$, $P<0.001$),达到雌成虫表达量的 6.33倍;在 2 龄幼虫体内的表达量次之,达到雌成虫的 3.21 倍;*Sihsc*70 在 5 龄幼虫中的表达量为雌成虫的 1.86倍;1, 3, 4 和 6 龄幼虫,雌蛹,雄蛹和雄成虫中相对表达量为雌成虫的 1.08 ~1.25 倍(图 5: B)。

2.5.3　低温胁迫下的表达差异分析:大螟 5 龄幼虫

经 0 和 -2℃处理后,*Sihsc*70 表达量略微下降,分别为对照组(27℃)的 85.03% 和 80.79%;当处理温度为 -4, -6 和 -8℃时,大螟体内 *Sihsc*70 表达量增加,分别达到对照组(27℃)的 1.33,1.74 和 1.71 倍(图 5: C)。这表明 -4℃ ~ -8℃的低温对 *Sihsc*70 的表达有一定的诱导作用,但方差分析结果表明表达差异不显著($F_{5,11}$ = 1.218, P = 0.363),这也说明该基因为组成型的 HSP70 基因。

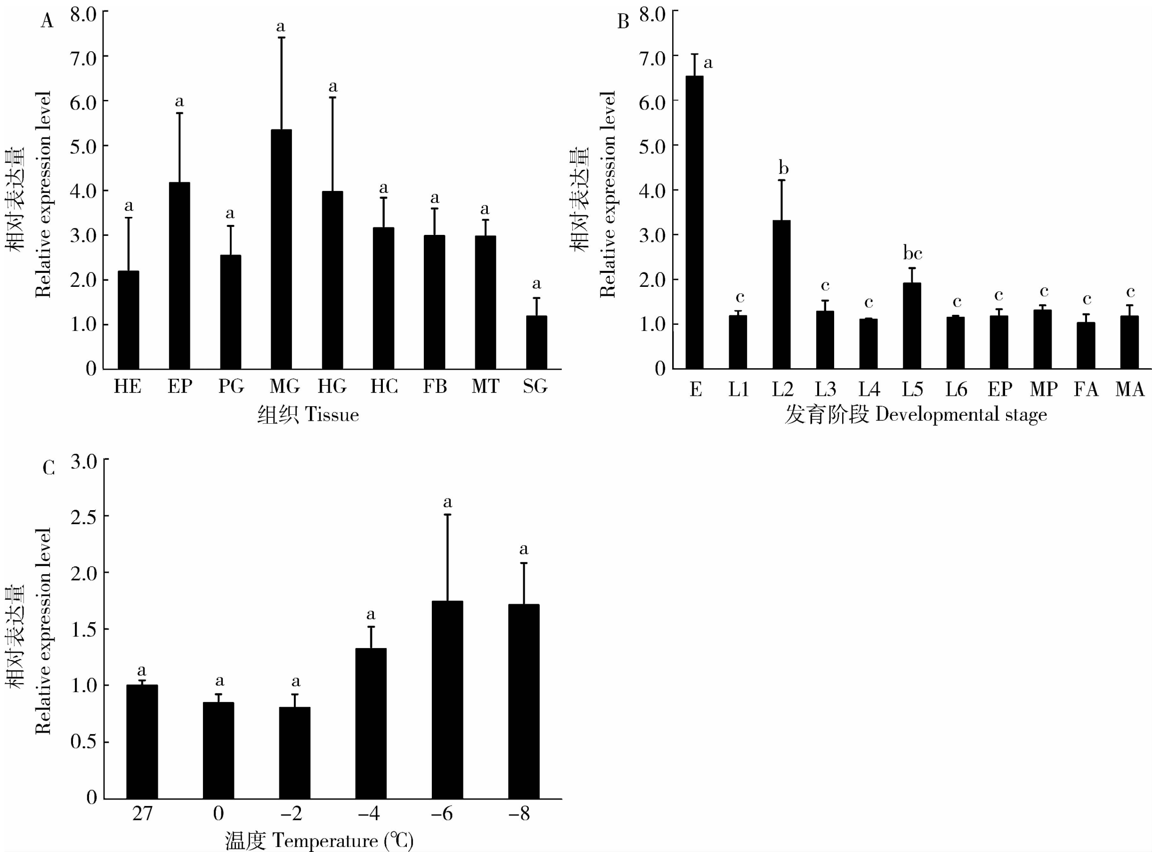


图 5 大螟 HSC70 基因(*Sihsc*70)在 5 龄幼虫不同组织(A)、不同发育阶段(B)和低温胁迫下(C) mRNA 相对表达量
Fig. 5 Relative mRNA expression levels of HSC70 gene (*Sihsc*70) in different tissues of the 5th instar larva (A), in different developmental stages (B) and under low-temperature stress (C)

HE: 头部 Head; EP: 体壁 Epidermis; FG: 前肠 Foregut; MG: 中肠 Midgut; HG: 后肠 Hindgut; HC: 血淋巴 Haemocytes; FB: 脂肪体 Fat body; MT: 马氏管 Malpighian tubules; SG: 唾腺 Salivary glands. E: 卵 Egg; L1: 1 龄幼虫 1st instar larva; L2: 2 龄幼虫 2nd instar larva L3: 3 龄幼虫 3rd instar larva; L4: 4 龄幼虫 4th instar larva; 5: 5 龄幼虫 5th instar larva; L6: 6 龄幼虫 6th instar larva; FP: 雌蛹 Female pupa; MP: 雄蛹 Male pupa; FA: Female adult; MA: 雌成虫 Male adult. 每个处理 3 个重复,图中数据为平均值 ± 标准差;柱上不同字母表示相对表达量差异显著(P < 0.05, Tukey 氏多重比较检验)。Each treatment includes three replicates. The data are denoted as mean ± *SD*. Different letters above bars represent significant difference in relative expression level at the 0.05 level (Tukey's multiple comparison test).

3 讨论

大螟在早年一直被认为是水稻上的次要害虫,人们也一直不重视它的防治与研究。20 世纪 70 年代后期大螟种群数量开始上升,80 年代到 90 初期大螟种群数量局部地区上升很快,但为害没有像二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker)和三化螟 *Tryporyza incertulas* (Walker)那么严重(胡建章,1983);90 年代中期至今,大螟在我国东部一些稻区的危害已超过二化螟,并由次要害虫上升为主要害虫(吴和生等,1995;陈复斌和刘福海,2001;李洪山等,2002;徐修龙等,2009;徐丽娜等,2011;吉海龙等,2012;樊道怀等,2014)。根据我们的调查研究,大螟的危害区域也有向北延伸的趋势。热激蛋白是一类响应环境胁迫的重要蛋白质,而 HSP70 是热激蛋白家族中与生物体环境适应性最为相关的一类热激蛋白(Sonoda *et al.*, 2006a; Rinehart *et al.*, 2007; Zhang and Denlinger, 2010),为此我们应用 RT-PCR 及 RACE 技术首次克隆得到了大螟 HSC70 基因,并对

其表达进行了研究。

本研究克隆获得的基因编码 653 个氨基酸，预测蛋白质分子量为 71.6 kDa，在预测氨基酸序列中也发现了 3 个 HSP70 家族标签序列。这些序列特征与西非蛀茎夜蛾、美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* (Boddie)、二化螟等昆虫的热激蛋白 70 基因 (Gkouvitsas *et al.*, 2009; Zhang and Denlinger, 2010；崔亚东等，2010) 类似，这表明我们获得的基因属于 HSP70 基因家族。有研究表明，*hsp*70 在胁迫条件下很短的时间内可被诱导表达数十甚至数百倍，常不含有内含子；而 *hsc*70 在胁迫条件下表达量变化不显著，常含有内含子 (Chuang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008)。本研究克隆得到的 *Sihsc*70 含有 2 个内含子，且 −4℃ ~ −8℃的低温对 *Sihsc*70 的表达诱导差异不显著，仅使其表达量比对照组 (27℃) 分别增加了 0.33 倍 (−4℃)、0.74 倍 (−6℃) 和 0.71 倍 (−8℃)。可能正是因为 *Sihsc*70 为组成型的 HSP70 基因，其功能以细胞基本生理活动有关，不能对短时间内的低温胁迫进行响应，换句话说，其不能被短时间内的低温胁迫大量诱导表达，所以才"允许"其中有内含子的存在；可以肯定，大螟也具有诱导型的 HSP70 基因，其中可能无内含子存在，以便对环境胁迫快速响应，这需要进一步的研究来证实。

本研究中，昆虫 HSC70 系统发育树被分成 2 支，这 2 个分支包括了 2 类位于不同亚细胞位置的 HSC70 (细胞质 HSC70 和内质网 HSC70)。大螟 HSC70 与其他细胞质 HSC70 聚在一起，可见我们实验获得的大螟 HSC70 基因序列是正确可靠的。本研究得出系统进化关系符合传统形态学分类观点，故 HSC70 基因可以作为标记基因研究物种系统进化关系。

在红尾肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 中，*hsc*70 在脑、真皮、中肠和脂肪体中的表达量依次减少 (Denlinger *et al.*, 2001)。而本研究的结果显示，*Sihsc*70 在中肠、后肠和体壁中的表达相对较高。这可能是因为，大螟中肠主要功能是分泌消化液、消化食物和吸收营养物质，需要合成大量消化酶，需要大量 HSC70 协助消化酶前体正确折叠和运输；而行使重吸收水分、无机盐和其他营养物质等功能的后肠与中肠一样，不可避免会接触到食物中的有毒物质，这些有毒物质会使很多功能蛋白质变性失活，*Sihsc*70 在后肠与中肠中具有较高的表达量可以使重要功能蛋白质免遭这些毒素的危害；体壁是大螟体内环境与外界环境之间的屏障，环境胁迫因子直接作用在体壁上，*Sihsc*70 在此处大量表达可以协助大螟抵抗环境胁迫的危害。此外，有研究发现，热激蛋白在调控昆虫生长发育方面起到重要的作用 (Morrow and Tanguay, 2003; Sharma *et al.*, 2007)。美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativa* Blanchard、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius) 和西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 的 *hsc*70 随着生长发育呈上调的趋势，在成虫期达到最大值 (Huang *et al.*, 2009; Shu *et al.*, 2011；李鸿波，2013)。大螟 *hsc*70 的表达模式与它们不同，*Sihsc*70 在卵、2 龄幼虫和 5 龄幼虫期表达量较其他发育阶段高，这可能是大螟 HSC70 与前 3 种昆虫的 HSC70 在各自生长发育过程中作用不同的原因。有研究表明，低温不能诱导二化螟、西非蛀茎夜蛾、黑腹果蝇、棉铃虫和白蜡虫 *Ericerus pela* Chavannes 的 *hsc*70 表达 (Sonoda *et al.*, 2006b; Gkouvitsas *et al.*, 2009; Colinet *et al.*, 2010; Zhang and Denlinger, 2010；刘魏魏等，2013)。而本研究表明，*Sihsc*70 在低温胁迫下虽然有上调表达的趋势，但诱导强度并不大，这也说明了该基因为组成型的 HSP70 基因。

本研究只克隆了大螟 HSP70 家族中组成型成员，而诱导型和中间型的 HSP70 在大螟中也应该存在，我们将在今后的研究中对这两种类型的 HSP70 展开研究。此外，本研究也仅仅是从基因水平研究了大螟 HSC70 的表达，有必要从蛋白质水平或采用 RNA 干扰技术来研究该基因的表达及功能，特别是研究大螟各种热激蛋白之间以及热激蛋白与其他逆境胁迫响应蛋白质之间的相互关系，这对了解大螟对环境胁迫适应的分子机理具有重要意义。

参考文献 (References)

Azuma S, 1977. Biological studies on the sugar cane insect pests in Okinawa, with special reference to the change of their composition and infestation in relation to the introduction of new commercial sugar cane varieties. *The Science Bulletin of the College of Agriculture, Universikty of Ryukyus*, 24: 1 – 158.

Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Auffret M, Moraga D, 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (*hsc*70) and heat shock protein 70 (*hsp*70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperon.*, 8(1): 76 – 85.

Callahan MK, Chaillot D, Jacquin C, Clark PR, Ménoret A, 2002. Differential acquisition of antigenic peptides by Hsp70 and Hsc70 under oxidative conditions. *J. Biol. Chem.*, 277(37): 33604 – 33609.

Chen FB, Liu FH, 2001. Research on the infestation of *Sesamia*

inferens. *Plant Protect. Technol. Extens.*, 21(9): 18–20. [陈复斌, 刘福海, 2001. 水稻大螟为害规律的调查与研究. 植保技术与推广, 21(9): 18–20]

Chuang KH, Ho SH, Song YL, 2007. Cloning and expression analysis of heat shock cognate 70 gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Gene*, 405(1): 10–18.

Colinet H, Lee SF, Hoffmann A, 2010. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.*, 277(1): 174–185.

Cui YD, Lu MX, Du YZ, 2010. Cloning of the heat shock protein 70 gene from *Chilo suppressalis* and analysis of expression characteristics under heat stress. *Acta Entomol. Sin.*, 53(8): 841–848. [崔亚东, 陆明星, 杜予州, 2010. 二化螟热休克蛋白 70 基因的克隆及热胁迫下的表达分析. 昆虫学报, 53(8): 841–848]

Denlinger DL, Rinehart JP, Yocum GD, 2001. Stress proteins: a role in insect diapause. In: Denlinger DL, Giebultowicz JM, Saunders DS eds. Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality. Elsevier, Amsterdam. 155–171.

Fan DH, Wang XZ, Zhu CW, Hu YL, 2014. The control efficacy of different insecticides to *Sesamia inferens* on rice. *Modern Agricultural Science and Technology*, (1): 99. [樊道怀, 王新忠, 朱昌稳, 胡玉龙, 2014. 不同药剂防治水稻大螟效果研究. 现代农业科技, (1): 99]

Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61(1): 243–282.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A, 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.*, 31(13): 3784–3788.

Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A, 2009. Cognate *Hsp*70 gene is induced during deep larval diapause in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Mol. Biol.*, 18(2): 253–264.

Gu HN, 1985. Preliminary study on the characteristics of hibernation of pink rice borer, *Sesamia inferens* Walker. *Acta Ecol. Sin.*, 5(1): 64–70. [顾海南, 1985. 大螟越冬特性的初步研究. 生态学报, 5(1): 64–70]

Gupta RS, Golding GB, 1993. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *J. Mol. Evol.*, 37(6): 573–582.

Han C, Peng YF, Hou ML, Chen FJ, Zhai BP, Han LZ, 2012. A preliminary study on artificial rearing of the pink stem borer, *Sesamia inferen*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 49(1): 281–285. [韩超, 彭于发, 侯茂林, 陈法军, 翟保平, 韩兰芝, 2012. 大螟人工饲养技术的初步研究. 应用昆虫学报, 49(1): 281–285]

Hartl FU, Hayer-Hartl M, 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561): 1852–1858.

Hu JZ, 1983. Preliminary analysis of population change characteristics and reason of *Sesamia inferens* on hybrid rice. *Jiangsu Agric. Sci.*, (11): 22–24. [胡建章, 1983. 杂交水稻大螟的发生特点及种群变动原因初析. 江苏农业科学, (11): 22–24]

Huang LH, Wang CZ, Kang L, 2009. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativa*. *J. Insect Physiol.*, 55(3): 279–285.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A, 2005. Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations. *Genes Immun.*, 6(4): 279–284.

Ji HL, Tang LD, Xu CP, Shen XP, Wu XY, Pan LF, 2012. Study on population dynamic and integrated control techniques of *Sesamia Inferens* in Kunshan. *J. Agric. Catastrophol.*, 2(1): 9–11. [吉海龙, 汤留弟, 徐彩萍, 沈晓萍, 吴向阳, 潘林芳, 2012. 昆山地区水稻大螟种群数量动态及综防技术研究. 农业灾害研究, 2(1): 9–11]

Kelley LA, Sternberg MJE, 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.*, 4(3): 363–371.

Kregel KC, 2002. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.*, 92(5): 2177–2186.

Lee U, Rioflorido I, Hong SW, Larkindale J, Waters ER, Vierling E, 2007. The *Arabidopsis* ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J.*, 49(1): 115–127.

Li HB, 2013. Response to Thermal Stress in Western Flower Thrips, *Fronkliniella occidetalis*. PhD Dissertation, Yangzhou University, Jiangsu. 101–117. [李鸿波, 2013. 入侵害虫西花蓟马对温度胁迫的响应. 江苏扬州: 扬州大学博士学位论文. 101–117]

Li HS, Li CH, Li HY, Zhao Y, Chen HX, 2002. *Sesamia inferens* population fluctuation characteristics and migrated law between hosts in the northern Jiangsu. *Plant Protect. Technol. Extens.*, 22(10): 13–16. [李洪山, 李慈厚, 李红阳, 赵阳, 陈洪新, 2002. 苏北稻区水稻大螟种群消长特点及在寄主间的转换规律. 植保技术与推广, 22(10): 13–16]

Lindquist S, 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 55(1): 1151–1191.

Liu WW, Yang P, Chen XM, 2013. Expression analysis of heat shock protein genes in *Ericerus pela* under cold stress. *Forest Res.*, 26(6): 681–685. [刘魏魏, 杨璞, 陈晓鸣, 2013. 白蜡虫热激蛋白基因在低温胁迫下的表达分析. 林业科学研究, 26(6): 681–685]

Mia AM, Iwahashi O, 1999. Seasonal changes in infestation level of sugarcane by the pink borer, *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae), in relation to a parasitoid, *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), on Okinawa island. *Appl. Entomol. Zool.*, 34(4): 429–434.

Morrow G, Tanguay RM, 2003. Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 14(5): 291–299.

Nover L, Scharf KD, 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 53(1): 80–103.

Parsell DA, Lindquist S, 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 27(1): 437–496.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin T, 2004. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13): 1605 - 1612.

Polier S, Dragovic Z, Hartl FU, Bracher A, 2008. Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell*, 133(6): 1068 - 1079.

Ravaux J, Toullec JY, Léger N, Lopez P, Gaill F, Shillito B, 2007. First *hsp*70 from two hydrothermal vent shrimps, *Mirocaris fortunata* and *Rimicaris exoculata*: characterization and sequence analysis. *Gene*, 386(1): 162 - 172.

Rinehart JP, Li AQ, Yocum GD, Robich RM, Hayward SAL, Denlinger DL, 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (27): 11130 - 11137.

Sharma S, Rohilla MS, Tiwari PK, 2007. Developmental and hyperthermia-induced expression of the heat shock proteins HSP60 and HSP70 in tissues of the housefly *Musca domestica*: an in vitro study. *Genet. Mol. Biol.*, 30(1): 159 - 168.

Shu YH, Du Y, Wang JW, 2011. Molecular characterization and expression patterns of *Spodoptera litura* heat shock protein 70/90, and their response to zinc stress. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 158 (1): 102 - 110.

Sonoda S, Ashfaq M, Tsumuki H, 2006a. Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock protein genes (*hsp*90, *hsc*70, and *hsp*19.5) from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 62(2): 80 - 90.

Sonoda S, Fukumoto K, Izumi Y, Yoshida H, Tsumuki H, 2006b. Cloning of heat shock protein genes (*hsp*90 and *hsc*70) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Arch. Insect. Biochem.*, 63(1): 36 - 47.

Sørensen JG, 2010. Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and exposure to stress in natural populations. *Current Zoology*, 56(6): 703 - 713.

Wang H, Dong SZ, Li K, Hu C, Ye GY, 2008. A heat shock cognate 70 gene in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*, and its expression in relation to thermal stress. *BMB Rep.*, 41(5): 388 - 393.

Wu HS, Jiang HZ, Wang HQ, Wang QZ, Zhou QX, Xue GX, 1995. *Sesamia inferens* rebound rapidly on Dongtai rice. *Plant Protect. Technol. Extens.*, 15(4): 37 - 38. [吴和生, 姜海洲, 王宏庆, 王权章, 周群喜, 薛根祥, 1995. 东台市水稻大螟迅猛回升. 植保技术与推广, 15(4): 37 - 38]

Xu LN, Li CC, Hu BJ, Zhou ZY, Li XX, 2011. Review of history, present situation and prospect of pink stem borer in China. *Chin. Agric. Sci. Bull.*, 27(24): 244 - 248. [徐丽娜, 李昌春, 胡本进, 周子燕, 李晓霞, 2011. 中国大螟研究历史、现状与展望. 中国农学通报, 27(24): 244 - 248]

Xu XL, Wang GT, Wang GL, Ge X, 2009. Investigation and control measures of *Sesamia inferens* on rice. *Modern Agric. Sci. Technol.*, (5): 134. [徐修龙, 王国田, 王广兰, 葛霞, 2009. 水稻大螟发生情况与防治措施. 现代农业科技, (5): 134]

Zhang QR, Denlinger DL, 2010. Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm. *J. Insect. Physiol.*, 56(2): 138 - 150.

Zhang SM, 1965. A discussion on the line of demarcation of the Palearctic and Oriental regions east of Chinling based on the knowledge of the distribution of some agricultural insects. *Acta Entomol. Sin.*, 14(4): 411 - 419. [章士美, 1965. 从某些农业昆虫的分布来讨论古北、东洋两地区在我国秦岭以东的分界线问题. 昆虫学报, 14(4): 411 - 419]

（责任编辑：赵利辉）